Aus dem C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

DIE WIRKUNG DES ALKOHOLENTZUGS AUF DIE PROTEINSYNTHESE IN GEHIRN UND LEBER DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HANS-DIETER GREIFE

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538105_0056

Aus dem C. und O. Vogt-Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

DIE WIRKUNG DES ALKOHOLENTZUGS AUF DIE PROTEINSYNTHESE IN GEHIRN UND LEBER DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

HANS-DIETER GREIFE

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:Prof.Dr. Brüster

Referent
gez.:Priv-Doz.Dr. Goertz

Korreferent
gez.:Prof.Dr. Kröner

Gewidmet meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Material und Geräte

2.1. Versuchstiere

2.2. Substanzen

2.3. Geräte

3. Methoden

3.1. Gewichtsmessung und Verfahren zur Bestimmung des Verhaltens der Ratten

3.2. Präparation der Teilkomponenten zellfreier Systeme der Proteinsynthese

3.2.1. Isolierung der Polysomen

3.2.2. Präparation der S-100 Enzyme

3.2.3. Extraktion der t-RNA

3.3. Standardsysteme zur Messung der biologischen Aktivitäten der einzelnen Komponenten der Protein synthetisierenden Systeme in vitro

3.3.1. Polysomale Systeme

3.3.2. Testsysteme zur Aminoacylierung der t-RNA

3.4. Statistische Methoden

4. Ergebnisse

4.1. Gewichtsverlauf und Verhalten der Ratten unter Alkoholentzug

4.2. Polysomen

4.2.1. Vergleich der Präparationsmethoden zur Isolierung der messenger-Ribosomen-Komplexe

4.2.2. Gehalt der Gewebe an extrahierbaren messenger-Ribosomen-Komplexen

4.2.3. Biologische Eigenschaften der Polysomen in den zellfreien Systemen

4.3. S-100 Enzyme

4.3.1. Gehalt der Gewebe an löslichen Enzymen

4.3.2. Vergleich der biologischen Aktivitäten der löslichen Enzyme

4.4. t-RNA

4.4.1. Gehalt der Gewebe an extrahierbarer t-RNA

4.4.2. Biologische Eigenschaften der t-RNA

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
CP	Creatinphosphat
CPK	Creatinphosphokinase
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desribonucleinsäure
dpm	Anzahl der Zerfallsereignisse pro Minute
DTT	Dithiotreitol
FG	Feuchtgewicht
GTP	Guanosintriphosphat
Leu	Leuzin
Lys	Lysin
Met	Methionin
M	Molekulargewicht
m-RNA	messenger-Ribonucleinsäure
Phe	Phenylalanin
RNAse	Ribonuclease
RNP	Ribonucleinpartikel
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
s-RNA	soluble-Ribonucleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
t-RNA	transfer-Ribonucleinsäure
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

Alkohol ist heute in den Industriestaaten die Droge mit der größten sozialmedizinischen Bedeutung. Rund 4 - 5 % der Gesamtbevölkerung der Bundesrepublik Deutschland sind manifest behandlungsbedürftige Alkoholkranke. Neben den häufigsten bekannten chronischen Alkoholvergiftungsfolgen wie Fettleber, Hepatitis, Leberzirrhose, Pankreatitis, Kardio-, Myo- und Polyneuropathien kommen auch neurologisch-psychiatrische Alkoholschäden wie die Wernicke Encephalopathie und das Korsakow-Syndrom vor. Ursache dieser Erkrankungen sind alkoholbedingte primäre oder sekundäre Veränderungen des Stoffwechsels der Leberzellen und offenbar auch der Nerven- und Gliazellen. Es ist jedoch nicht möglich, menschliches Hirn- und Lebergewebe auf diese Veränderungen hin zu untersuchen. Daher wurden als Modell zur Untersuchung der biochemischen Veränderungen der Stoffwechselvorgänge in Hirn- und Lebergewebe üblicherweise Laboratoriumstiere benutzt, welche zuvor über definierte Zeiträume anstelle des Trinkwassers ausschließlich Alkohollösungen verabreicht bekamen.

Über den Einfluß der chronischen Alkoholintoxikation auf den Proteinstoffwechsel von Gehirn-

und Lebergewebe sind zahlreiche Arbeiten (1 - 7) veröffentlicht worden. Dagegen gibt es nur wenige Untersuchungen über Stoffwechselveränderungen in diesen Organen, die durch Alkoholentzug nach langdauernder Alkoholexposition hervorgerufen wurden (8).
Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Proteinstoffwechsel in Großhirn- und Leberzelle gerade unter diesen Bedingungen zu untersuchen. Wir wählten als Versuchstiere Ratten aus; methodisch verwendeten wir zur Untersuchung des proteinsynthetisierenden Apparates die Technik der zellfreien Proteinsynthese.

Ziel der Arbeit war es, zu prüfen, ob unter Alkoholentzug Änderungen der biochemischen Eigenschaften der proteinsynthetisierenden Systeme in beiden Organen auftreten, die möglicherweise sogar mit Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere in Einklang zu bringen sind.

2. Material und Geräte

2.1. Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden 12 Wochen alte weibliche Ratten (180 - 260 gr Ausgangsgewicht) eines Wistar-Stammes, die in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gezüchtet worden waren, benutzt. Die Ratten wurden in Gruppen zu fünf Tieren gehalten. Alle Tiere wurden mit der Standarddiät für Ratten Nr. 1314 (Altromin-GmbH Lage) ad libitum gefüttert. Eine Gruppe der Tiere erhielt anstelle des Trinkwassers über 20 Wochen eine 10 %ige Lösung von Athanol in Wasser, der zur Überwindung des aversiven Geschmacks der Versuchstiere gegenüber dem Äthanol Saccharose in einer Endkonzentration von 2 % zugesetzt wurde. Bei der einen Hälfte der alkoholtrinkenden Tiere wurde 5 Tage, bei der anderen Gruppe 10 Tage vor der Tötung der Ratten das Alkoholgemisch durch Trinkwasser ersetzt.

Zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurden die Ratten dekapitiert, Gehirne und Lebern innerhalb von 45 sec herauspräpariert, mit eiskaltem Puffer von Blut freigespült und sofort in flüssigem Stickstoff (bei -192 ^{o}C) eingefroren. Die Gehirne,

die mit einem Skalpell in Cerebellum, Hirnstamm und Großhirn zerlegt worden waren und die Lebern wurden bis zur Präparation der Komponenten der Protein synthetisierenden Systeme bei -80 °C gelagert.

2.2. Substanzen

Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
[^{14}C] - Aminosäuren	Amersham Buchler, Braunschweig
[^{14}C] - Leucin (58,0 mCi/mMol)	
[^{14}C] - Lysin (68,4 mCi/mMol)	
[^{14}C] - Methionin (60,0 mCi/mMol)	
[^{14}C] - Phenylalanin (58,2 mCi/mMol)	
[^{14}C] - Proteinhydrolysat (57,0 mCi/mA C)	
Creatinphosphat	Boehringer, Mannheim
Creatinphosphokinase	Boehringer, Mannheim
Cytosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Diäthylpyrocarbonat (DEP)	Boehringer, Mannheim
Dithiothreitol	Biomol, Ilvesheim
Guanosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
HEPES	Boehringer, Mannheim
8-Hydroxychinolin	Merck, Darmstadt
m-Kresol	Merck, Darmstadt
Natriumheparinat	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Natrium-Dodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Selecta Faltenfilter (Nr. 598, ⌀ 385 mm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Selecta Filterplättchen (Nr. 598, ⌀ 25 mm)	Schleicher und Schüll, Dassel

Sephadex G 25 M - Fertigsäulen	Pharma Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Visking-Dialysierschläuche (Nr. 44110 Typ 20/32)	Serva, Heidelberg

Vorbereitung: in 10^{-6} M EDTA (Triplex III) 1 h bei 90 °C erhitzt zur Inaktivierung der RNasen

2.3. Geräte

Potter-Elvehjem-Teflon-Glas-Homogenisator	Braun, Melsungen
Dounce-Glas-Glas-Homogenisator	Tri-R-Instruments, Rockvill N.Y., USA
Gradientenformer Mixograd	Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France
Spektralphotometer UV 200	Shimadzu, Tokyo, Japan
Colora Recorder 1100	Colora GmbH, Lorch/Württ.
UA-5 Absorbance Monitor	Isco, Instruments Specialties Co, Lincoln, Nebraska, USA
Flüssigkeitsszintillationszähler Tricarb Modell 3380	Packard, Frankf./M.
SS 34 Zentrifuge	Sorvall, Newtown, Conn., USA
OTD 75 B Ultrazentrifuge	Sorvall, Newtown, Conn., USA
Ultrazentrifuge Omega II 70.000	Heraeus Christ, Osterode

3. Methoden

3.1. Gewichtsmessung und Verfahren zur Bestimmung des Verhaltens der Ratten

Sowohl die Alkohol als auch die Wasser trinkenden Ratten wurden während des gesamten Versuchsverlaufes beobachtet. Um eine Beeinflussung der Proteinbiosynthese der Großhirn- und Leberzelle der Versuchstiere durch Nahrungsmangel auszuschließen, wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen gewogen.

Zur orientierenden Bestimmung einer vorhandenen Verhaltensänderung wurde ein Kontrolltier und ein Alkohol trinkendes Tier unterschiedlich markiert, in einen Käfig zusammengesetzt und das Verhalten der beiden Tiere beobachtet.

Des weiteren wurde das Explorationsverhalten der Ratten aus den einzelnen Gruppen untersucht. Hierzu wurde das "hole-board" (9) benutzt. Dieses Gerät besteht aus einer schwarz angestrichenen Box. Der Boden ist mit 24 Löchern mit einem Durchmesser von 3 cm auf einer Fläche von 1.700 cm^2 versehen und liegt einer weiteren schwarz angestrichen Box auf, sodaß die Löcher unendlich erscheinen. Die Tiere werden auf dieses "hole-board" gesetzt und die Häufigkeit, mit

der die Tiere ihren Kopf durch eines der Löcher stecken, wird registriert. Nur das vollständige Einführen des Kopfes wird als wahres explorati-ves Verhalten gezählt. Diese Versuchsanordnung mißt nicht nur die explorative Aktivität der Versuchstiere, sondern soll darüber hinaus ein empfindlicher Test zur Erfassung des "emotionalen Verhaltens" der Tiere sein (10).

Um die explorative Aktivität der nachtaktiven Ratten zu erfassen, wurde der Versuch um 14^{00} Uhr gestartet und nach 18 Stunden morgens um 8^{00} Uhr beendet. Zusätzlich wurden die Tiere in einem separaten Versuchsraum in der Tierversuchsanlage Düsseldorf gegen störende äußere Einflüsse abgeschirmt.

Während des Versuches wurden die Tiere aus technischen Gründen unter Nahrungs- und Flüssigkeitskarenz gehalten.

Schließlich wurde untersucht, ob bei den Alkohol trinkenden als auch bei den Tieren unter Entzug Krämpfe audiogen auslösbar waren. Dazu wurde mit einem Schlüsselbund gegen den Kasten, in dem sich das Versuchstier befand, geschlagen.

3.2. Präparation der Teilkomponenten zellfreier Systeme der Proteinsynthese

3.2.1. Isolierung der Polysomen

Polysomen kommen in der Säugetierzelle in zwei Formen vor: entweder frei im Cytoplasma oder an das endoplasmatische Retikulum gebunden. Ein Polysom besteht aus einer Ansammlung von Ribosomen, die an eine einzige m-RNA kette gebunden sind (11 - 13). Polysomen sind die funktionelle Einheit der Proteinbiosynthese (14). Die Größe der Polysomen variiert stark, da sie von der Länge der m-RNA Kette abhängt. Zum Beispiel findet man 12 - 20 Ribosomen auf einem RNA-Molekül, welche Proteine im Bereich von Massengewichten von 30.000 bis 50.000 (300 - 500 Aminosäuren) synthetisieren. Bei maximaler Ausnutzung einer m-RNA Kette findet man ein Ribosom pro 80 m-RNA-Nucleotide (16).

Zur Präparation der Polysomen wurden zwei unterschiedliche Methoden benutzt:

1. Präparation nach Lerner et al (13)

Zur Präparation wurden 2 bis 3 gr Gewebe, das bei -80 °C gelagert war, auf +3 °C aufgetaut und dann mit dem 2,5 fachen Volumen Extraktionspuffer versetzt, der folgende Ionenkonzentrationen

enthielt: 20 mM Tris HCL, pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$, KCL 100 mM, NaCl 40 mM, Dithiothreitol 1 mM, NH_4Cl 8.3 mM, Glukose 10 mM, Saccharose 250 mM und Natriumheparinat 10 mg/l. Alle Präparationsschritte wurden bei +3 °C durchgeführt. Zwischen den Arbeitsgängen wurde die Probe in Eis aufbewahrt. Das Gewebe wurde zunächst mit einer Schere zerkleinert und dann mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator durch fünf- bis siebenmaliges Auf- und Abwärtsbewegen des Teflonpestills homogenisiert. Das Homogenat wurde dann zur Gewinnung der Polysomen bei 12.000 x g 20 min zentrifugiert (Sorvall SS 3) und anschließend wurde der Überstand, der die freien Polysomen enthielt, entnommen. Die mitochondriale Rohfraktion wurde in einfachem Puffervolumen resuspendiert, erneut homogenisiert und 20 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden bis zur weiteren Präparation der freien Polysomen in Eis aufbewahrt.

Zur Gewinnung der membrangebundenen Polysomen wurde das Pellet bei 12.000 x g in 2,5fachem Volumen Extraktionspuffer aufgenommen und homogenisiert. Das Homogenat wurde mit Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % im Gesamthomogenat versetzt, 15 min im Eis mit einem Magnetrührer gerührt und anschließend bei 12.000

x g 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, das Pellet in einfachem Volumen Puffer aufgenommen, homogenisiert, mit 1 %igem Triton X-100 versetzt, erneut 15 min lang gerührt und 20 min bei 12.000 x g abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, das Pellet verworfen.

Die postmitochondrialen Überstände, die die freien oder membrangebundenen Polysomen enthielten, wurden jeweils auf eine 2 M Saccharose im Volumenverhältnis 1:1 überschichtet und 16 h bei 100.000 x g (OTD 75B Sorvall 6 x 38 SW Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Präparation von t-RNA weiterverwendet. Nur hochmolekulare Substanzen, d.h. Polysomen, können die 2 M Saccharose durchdringen und am Boden des Zentrifugenglases pelletieren. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zentrifugenröhrchen vorsichtig, ohne das Pellet zu lösen, mit Extraktionspuffer ausgespült und die Innenwand des Zentrifugenglases zusätzlich mit einem Wattetupfer gereinigt. Je nach Größe des Pellets wurde dieses mit 0,5 - 2 ml Puffer versetzt und solange gewartet, bis es sich von der Wand des Zentrifugengläschens löste. Anschließend wurde das Pellet mit einem Dounce-Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert und in 0,5 ml Portionen in

flüssigem Stickstoff bei -192 °C eingefroren und gelagert. Die Menge extrahierter Polysomen wurde spektrometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm ermittelt. Als A_{260}-Einheit wurde die Menge an RNA bezeichnet, die in einem Milliliter Wasser (1 cm Lichtweg) die Absorption von 1,0 EE bei der Wellenlänge von 260 nm ergibt.

2. Mg^{++}-Präzipitation nach Palmiter (16)

Durch den Ausfall der Ultrazentrifuge und die anschließende langwierige Reparatur waren wir gezwungen, für die Präparation der Leberpolysomen ein anderes Verfahren zu suchen. Verwendet wurde ein Verfahren (16), das es ermöglicht, ohne Ultrazentrifugation Polysomen aus dem Zellsaft durch Mg^{++} in hoher Konzentration zu präzipitieren.

Dabei wurden zunächst folgende zwei Lösungen als Grundlage der benötigten Präparationspuffer hergestellt.

Puffer A: Hepes-KOH, pH 7.5, 100 mM + DEP

Puffer B: PB-DEP-Lösung, Tris-HCL, pH 7.5, 250 mM, NaCl 250 mM, $MgCl_2$ 50 mM + DEP

Beide Puffer wurden mit 2 Tropfen DEP pro 100 ml versetzt, bei Zimmertemperatur geschüttelt, dann 30 min in ein kochendes Wasserbad gestellt und danach erneut zur Beseitigung von entstehendem CO_2 und Äthanol geschüttelt. Diese Prozedur

wurde zwei Mal wiederholt. Der Flüssigkeitsverlust wurde nach dem Abkühlen mit H_2O ausgeglichen. 2 - 3 gr Lebergewebe wurden mit 9 fachem Volumen 10 %igen Puffers B in Wasser + 1 mg/ml Heparin und 2 % Triton X-100 versetzt, mit der Schere zerkleinert, im Potter durch fünf- bis siebenmaliges Auf- und Abwärtsbewegen des Teflonpestills homogenisiert und 10 min bei 27.000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Homogenisationspuffer + 0,2 M $MgCl_2$ versetzt und 60 min bei 0 °C im Eisbad gerührt. Anschließend wurde der Überstand auf 1 M Saccharose, die in 10 %igem Puffer B gelöst war, im Verhältnis 2:1 aufgetragen und 30 min bei 27.000 x g abzentrifugiert. Unter diesen Bedingungen pelletieren die durch Mg^{++} präzipitierten RNP. Der Überstand wurde entfernt und zur t-RNA Präparation weiterverwendet. Die Innenwand des Zentrifugenglases wurde vorsichtig mit H_2O gespült und mit einem Watteträger von Rückständen gereinigt. Je nach Größe des Pellets wurden 0,5 - 3 ml eines 20 %igen Puffers A hinzugefügt und mit einem Dounce-Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert. Die RNP-Fraktionen wurden nach Bestimmung der Menge extrahierter Polysomen durch Messung der Absorption bei 260 nm in 0,5 ml Portionen in flüssigem Stickstoff bei -192 °C gelagert.

3.2.2. Präparation der S-100 Enzyme

Für die Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese benutzten wir als Enzymfraktion den chromatographisch gereinigten postmikrosomalen Überstand (S-100). Diese Enzymfraktion bietet gegenüber pH 5 und AS-70 Enzymen den Vorteil, daß sie innerhalb weniger Stunden zu präparieren ist. Ein Nachteil besteht darin, daß S-100 Enzyme nur wenige Wochen in flüssigem Stickstoff lagerbar sind, da sie rasch an Aktivität verlieren, während pH 5 und AS-70 Enzyme bei -60 °C mindestens 1 Jahr stabil sein sollen (17). Wir verwendeten die S-100 Enzyme innerhalb weniger Tage nach der Präparation.

2 - 3 gr Ausgangsmaterial wurden mit 4fachem Volumen Puffer (Leber) oder mit 2,5fachem Volumen Extraktionspuffer (Großhirn) versetzt, mit der Schere zerkleinert und im Teflon Glas-Homogenisator 10 mal homogenisiert. Die Präparation erfolgte bei +3 °C, die Probe wurde zwischen den nachfolgenden Arbeitsgängen in Eis gelagert.

Das Homogenat wurde bei 12.000 x g 20 min abzentrifugiert. Der Überstand (S 12) wurde danach bei 100.000 x g 2 h in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Die Pellets bei 12.000 x g und bei 100.000 x g wurden vereint und zur RNP-Prä-

paration weiterverwendet. Der Überstand (S-100) wurde durch eine mit ca. 100 ml Präparationspuffer zuvor aequilibrierte Sephadex G - 25 M Fertigsäule chromatographiert, um Nucleotide, freie Aminosäuren (18) sowie andere niedermolekulare Bestandteile (12) zu entfernen. Der Proteingehalt der Fraktion wurde mit der Methode nach Lowry (19) bestimmt.

3.2.3. Extraktion der t-RNA

Ausgangsmaterial für die t-RNA Präparation waren entweder die S-100 Überstände nach der fraktionierten Zentrifugation oder die S-27 Überstände nach der Magnesiumpräzipitation. Da die S-100 Überstände Saccharose in hoher Konzentration enthielten, wurden sie mit gleichem Volumen Munropuffer verdünnt, um eine korrekte Phasentrennung zu erzielen. Die Überstände wurden zunächst mit 25 µg/ml Proteinase K und 5 mg/ml SDS versetzt und für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Hierbei zerstört Proteinase K neben anderen Proteinen auch die Ribonukleasen (20), eine Wirkung, die durch Zugabe von SDS zu dem Inkubationsgemisch noch verstärkt wird (21).
Die Extraktion selbst erfolgte in Anlehnung an das von Avital und Elson (22) zur Isolierung der t-RNA aus Bakterien beschriebene Verfahren. Nach Inkubation wurde der Überstand mit einem gleichen Volumen Phenolreagenz (700 ml frisch destilliertes Phenol + 98 ml m-Kresol + 500 mg Hydroxychinolin + 110 ml H_2O) und 0,1 des Volumens Chloroform versetzt und für zwei Stunden bei +3 °C gerührt. Das Phenolgemisch wurde 15 min bei 12.000 x g abzentrifugiert. Dabei kam es zu einer 3-Phasentrennung: am Boden des Zentri-

fugenglases die klare Phenolphase, darüber die Lipid- und Proteinschicht und oben die klare wässrige Phase. Die wässrigen Überstände wurden abpipettiert, vereinigt und in einem Scheidetrichter mit gleichem Volumen Äther ausgeschüttelt, um Phenolrückstände zu entfernen. Nach Einstellung einer scharfen Phasengrenze zwischen wässriger und Ätherphase wurde der Äther entfernt und die wässrige Phase zur Entfernung des restlichen Äthers mit Stickstoff durchgast. Dann wurden mit einem 2,5fachen Volumen 95 %igem Äthanol + 2 % Kaliumacetat die Nucleinsäuren über Nacht bei -20 °C gefällt und anschließend durch Zentrifugation (20 min, 12.000 x g) pelletiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 10 ml 2 M Tris-HCL, pH 8.0 suspendiert und eine Stunde bei +20 °C gerührt. Dieser Schritt dient dazu, die noch an die t-RNA gebundenen Aminosäuren zu entfernen (Desacylierung). Anschließend wurden die Nucleinsäuren erneut mit dem 2,5 fachen Volumen Äthanol/kaliumacetat bei -20 °C gefällt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 M LiCl pH 5.1 resuspendiert und für eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Hierbei gehen nur die t-RNA und niedermolekulare RNA-Bruchstücke in Lösung, die höher molekularen r-RNA jedoch nicht. Nach erneuter Zentrifugation wurde der

Überstand entnommen und im Eis aufbewahrt. Das Pellet wurde mit 5 ml LiCl nachextrahiert und erneut 20 min bei Zimmertemperatur gerührt und abzentrifugiert. Die die t-RNA enthaltenden Überstände wurden vereinigt und zur Entfernung des Lithiums und der Oligonucleotide in Viskingschläuchen über Nacht gegen 10^{-6} M Magnesiumacetatlösung dialysiert. Das Dialysat wurde mit 2,5 fachem Volumen Äthanol/Kaliumacetat bei -20 °C für zwei Stunden gefällt, abzentrifugiert und je nach Größe des Pellets in 0,5 - 2 ml Aquabidest aufgenommen. Die t-RNA wurde nach Bestimmung der Absorption bei 260 nm in 0,5 ml Portionen bei -20 °C aufbewahrt. Die Lagerungsfähigkeit betrug mehr als 1 Jahr; Spektrophotometrische Veränderungen und Änderungen der biologischen Aktivitäten waren in diesem Zeitraum nicht zu beobachten. Die isolierte t-RNA wurde durch Elektrophorese in 7,5 %igen Polyacrylamid-Gelen auf ihre Reinheit hin überprüft. Danach zeigte sich, daß die Verunreinigung durch die 5 S r-RNA zu vernachlässigen war.

3.3. Standardsysteme zur Messung der biologischen Aktivitäten der einzelnen Komponenten der Protein synthetisierenden Systeme in vitro

3.3.1. Polysomale Systeme

Der polysomale Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein wurde in Standardsystemen gemessen, die in einem Gesamtvolumen von 125 µl die in Tabelle 1 aufgeführten Komponenten in den angegebenen Konzentrationen enthielten. Inkubiert wurden die Reaktionsgemische im Wasserbad bei +37 °C. Nach 60 min und 120 min wurden jeweils 0,05 ml aus den Testansätzen auf Filterplättchen pipettiert und in 10 %iger Trichloressigsäure bei 0 °C gefällt. Die nicht Proteingebundene Radioaktivität wurde anschließend mit der von Mans und Novelli beschriebenen Filterplättchenmethode beseitigt (23).
Dabei wurden die Filterplättchen 2 mal in 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure gewaschen, auf Faltenfiltern abgetropft und anschließend 15 min in 90 °C heißer 5 %iger Trichloressigsäure erhitzt, um die mit Aminosäuren beladene t-RNA zu hydrolysieren und so zu entfernen. Die Filterplättchen wurden erneut 2 mal in 5 %iger eis-

kalter Trichloressigsäure gewaschen, auf Faltenfiltern abgetropft und dann in einem Äther/Äthanolgemisch (1:1) mindestens 5 min belassen, um vorhandene Lipide zu entfernen. Anschließend wurden die Filterplättchen in Szintillationsfläschen bei 50 °C getrocknet und 10 ml Toluol-Szintillator (Quickszint 501, Fa. Zinsser, Frankfurt a. M.) hinzugefügt. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Packard Flüssigkeitsszintillationszähler (Tricarb Mod 3380) gemessen. Eine Quenchkorrektur der einzelnen Proben ist bei diesem Verfahren nicht notwendig, weil die Löscheffekte in den einzelnen Proben gleich und darüberhinaus so gering sind, daß sie vernachlässigt werden können.

Tabelle 1: Standardsystem der polysomalen Proteinsynthese

Tris-HCL, pH 7.4	12,500 µMol
NaCl	3,000 µMol
KCL	3,230 µMol
DTT	0,125 µMol
ATP	0,125 µMol
GTP	0,038 µMol
CPK	6,250 µg
CP	90,800 µg
CTP	0,125 µMol
Mg^{++}	0,750 µMol
[^{14}C] Proteinhydrolysat	0,050 µCi
S-100 Enzym	50,000 µg
Polysomen	1 A_{260} (1,25 A_{260})

Gesamtvolumen des Testansatzes: 125 µl

Tabelle 2: Standardsystem zur in vitro-Beladung der t-RNA

Tris-HCL, pH 7.4	12,500 µMol
NaCl	3,000 µMol
KCL	3,230 µMol
DTT	0,125 µMol
ATP	0,125 µMol
GTP	0,038 µMol
CPK	6,250 µg
CP	90,800 µg
Mg^{++}	1,500 µMol
CTP	0,125 µMol
[^{14}C] Aminosäure	0,250 µCi
t-RNA	0,5 A_{260}
S-100 Enzym	50,000 µg

Gesamtvolumen des Testansatzes: 125 µl

3.3.2. Testsysteme zur Aminoacylierung der t-RNA

Die Beladung der t-RNA wurde in dem Reaktionsgemisch untersucht, das die in Tabelle 2 aufgeführten Komponenten in einem Gesamtvolumen von 125 µl enthielt. Gemessen wurde dabei selektiv die Beladung der t-RNA^{Leu}, t-RNA^{Lys}, t-RNA^{Phe} und der t-RNA^{Met} in dem Gesamtgemisch der aus Gehirn oder Leber isolierten t-RNA. Inkubiert wurde das Reaktionsgemisch bei 37 °C. Nach 15 min und 30 min wurden jeweils 0,05 ml aus dem Testsystem entnommen, auf Filterplättchen pipettiert und in 10 %iger Trichloressigsäure bei 0 °C gefällt. Anschließend wurden die Filterplättchen 4 mal 5 min in 5 %iger eiskalter Trichloressigsäure gewaschen und auf Faltenfiltern abgetropft. Hierbei wird die nicht t-RNA-gebundene Radioaktivität entfernt. Zuletzt wurden die Filterplättchen 5 min in einem Äther/Äthanolgemisch (1:1) gewaschen, in Szintillationsfläschchen bei 50 °C getrocknet und zur Messung der Radioaktivität mit je 10 ml Toluolszintillator versetzt.

3.4. Statistische Methoden

Zur Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse wurden für alle gemessenen Parameter die Mittelwerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichungen (SD) der Daten aus den einzelnen Versuchsgruppen berechnet. Des weiteren wurden die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede hin geprüft. Als Signifikanz-Niveau wurde $p < 0,01$ angenommen. Zur Überprüfung der Gültigkeit (Überschreitungswahrscheinlichkeit) Wurde bei Bedarf der t-Test nach Student für ungepaarte Stichproben verwendet, nachdem vorher die Daten auf Normalverteilung geprüft worden waren (24).

4. Ergebnisse

4.1. Gewichtsverlauf und Verhalten der Ratten unter Alkoholentzug

1. Gewichtsverlauf

Das mittlere Gewicht der Tiere innerhalb der beiden Versuchsgruppen im Verlauf der Trinkperiode ist der Tabelle 3 zu entnehmen. Danach bestehen keine signifikanten Unterschiede der mittleren Gewichte der Tiere der Versuchsgruppen im Verlauf des gesamten Experiments.

2. Verhalten unter Alkoholentzug

Bei orientierender Beobachtung der Alkohol trinkenden Ratten und der Entzugstiere im Vergleich zu den Kontrollen und untereinander konnten auffällige Unterschiede im Gesamtverhalten der Tiere innerhalb der Versuchsgruppen nicht festgestellt werden. Ein Tremor war bei den Tieren während des gesamten Versuchsablaufes nicht zu beobachten.

Auch die Messung des Explorationsverhaltens innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen mit dem "hole-board" (9) ergab keine signifikanten Unterschiede. In Tabelle 4 sind die Mittelwerte der Gesamtzahl der gemessenen Im-

Tabelle 3 : Gewicht der Alkohol- und der Kontrolltiere im Verlauf der Trinkperiode

Dauer des Trinkversuches (in Wochen)	Gewicht (in gr)			
	Gruppe 5 Tage Entzug		Gruppe 10 Tage Entzug	
	Kontrolle	+ Alkohol	Kontrolle	+ Alkohol
0*	216 ± 20	217 ± 20	227 ± 13	226 ± 12
3	229 ± 17	224 ± 20	239 ± 9	234 ± 16
8	240 ± 22	240 ± 17	246 ± 12	240 ± 14
14	247 ± 20	236 ± 20	253 ± 18	247 ± 9
20	251 ± 23	242 ± 20	258 ± 15	249 ± 16
21*	239 ± 23	239 ± 24		
22*			251 ± 19	259 ± 18

$\bar{x} \pm SD$; n = 20, *n = 50

pulse der einzelnen Gruppen in einem Zeitraum von 18 Stunden dargestellt. Dabei setzte sich die Gruppe der Alkoholentzugstiere aus Tieren mit 1, 3, 5, 7 und 9 Tagen Entzug zusammen.

Tabelle 4 : Explorationsverhalten der Alkohol-, der Alkoholentzugs- und der Kontrolltiere auf dem "hole-board"

Versuchsgruppe	Explorationsaktivität (Impulse x 18 h^{-1})	p
Kontrolle	226 ± 81	n.s.
Alkohol	209 ± 92	n.s.
Entzug	307 ± 112	n.s.

$\bar{x}$ ± SD, n = 5; t-Test

Danach unterscheiden sich die Mittelwerte der Gesamtzahl der gemessenen Impulse der einzelnen Gruppen voneinander. Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen liegen aber nicht vor.

In den Abbildungen 1 a - c werden die zeitlichen Verteilungen der explorativen Aktivität der einzelnen Versuchsgruppen miteinander verglichen. In Abbildung 1 a ist die Verteilung der Impulse der Alkohol trinkenden Tiere mit der Kontroll-

gruppe, in Abbildung 1 b die Verteilung der Impulse der Alkoholentzugsgruppe mit der Kontrollgruppe und in Abbildung 1 c die Verteilung der Impulse der Alkohol trinkenden Tiere mit der Alkoholentzugsgruppe dargestellt.

Danach zeigt sich für alle Versuchsgruppen zu Beginn des Versuches innerhalb der ersten zwei Stunden eine hohe Explorationsaktivität und während der Nachtstunden mehrere uneinheitliche Aktivitätsmaxima. Die hohe Explorationsaktivität nach 16 h (entspricht 6^{00} Uhr morgens) läßt sich mit dem Beginn der Arbeitstätigkeit in der Tierversuchsanlage Düsseldorf und den daraus bedingten störenden Einflüssen in Einklang bringen, da die Tiere während des Versuchsablaufes nicht vollkommen gegen alle störenden Faktoren abgeschirmt werden konnten.

Der Vergleich der zeitlichen Verteilung der explorativen Aktivitäten der einzelnen Versuchsgruppen ergibt keine groben Unterschiede.

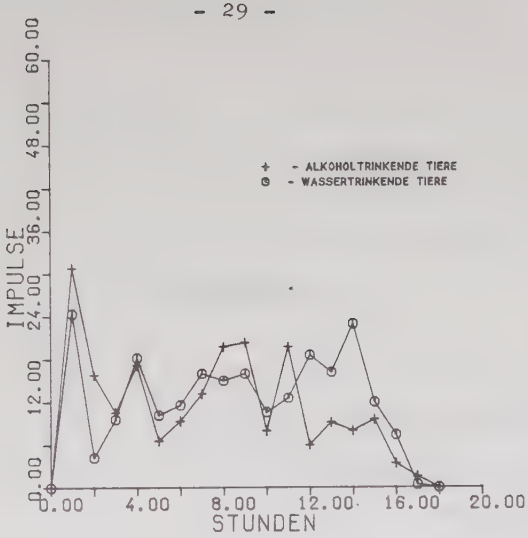

Abb. 1a : Vergleich der zeitlichen Verteilung der Explorationsaktivität von Alkohol trinkenden und Wasser trinkenden Tieren

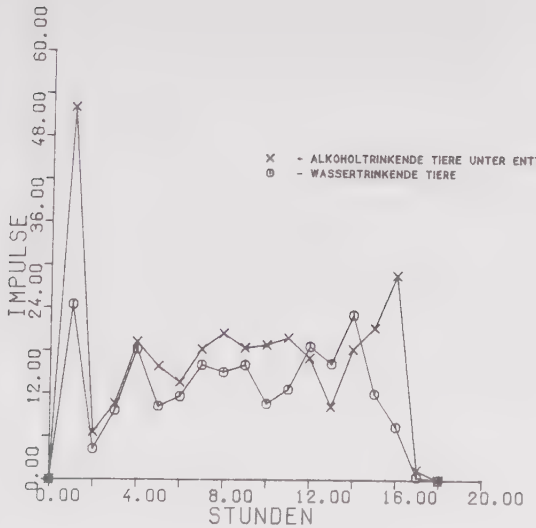

Abb. 1b : Vergleich der zeitlichen Verteilung der Explorationsaktivität von Alkohol trinkenden Tieren unter Entzug und Wasser trinkenden Tieren

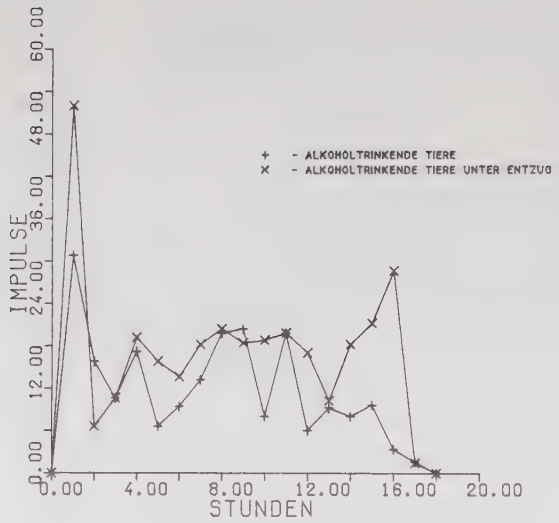

Abb. 1c : Vergleich der zeitlichen Verteilung der Explorationsaktivität von Alkohol trinkenden Tieren und Alkohol trinkenden Tieren unter Entzug

4.2. Polysomen

4.2.1. Vergleich der Präparationsmethoden zur Isolierung der messenger-Ribosomen-Komplexe

Zur Isolierung der Polysomen aus Großhirn- und Lebergewebe wurden unterschiedliche Präparationsverfahren verwendet. Die messenger-Ribosomen-Komplexe aus Lebergewebe wurden im wesentlichen mittels Präzipitation durch hohe Magnesiumkonzentrationen gewonnen. Dieses Verfahren ließ sich jedoch nicht auf das Großhirngewebe übertragen, denn die Ausbeuten von Polysomen aus Hirngewebe waren minimal. Dieses Ergebnis läßt sich wahrscheinlich auf den hohen Lipidgehalt des Hirngewebes der erwachsenen Tiere zurückführen, da die Mg^{++}-Präzipitation der Partikel aus Neugeborenenhirnen hohe Ausbeuten ergab. Um diese verschiedenen Präparationsverfahren zu vergleichen, wurden RNP aus Lebergewebe einmal durch Magnesiumpräzipitation, zum anderen durch Zentrifugation durch 2 M Saccharose isoliert und die Polysomenprofile nach Zentrifugation der Partikel im linearen Saccharosegradienten miteinander verglichen. Dazu wurden je 20 A_{260} Polysomen auf einen 15 bis 40 %igen linearen Saccharosegradienten aufge-

tragen, dessen Ionenkonzentrationen dem des Aufnahmepuffers entsprachen. Die Gradienten wurden 2 h in dem Sorvall SW-Rotor 6 x 38 bei 100.000 x g zentrifugiert. Nach Punktieren des Zentrifugenglasbodens wurde die UV-Absorption des auslaufenden Gradienten bei 254 nm kontinuierlich gemessen und mit einem externen Schreiber aufgezeichnet.

In Abbildung 2 ist ein Dichtegradientenprofil einer Leber RNP-Fraktion nach Isolierung der Partikel durch 2 M Saccharose dargestellt. Als "marker" diente eine Charge monomerer 80 S Ribosomen aus Leber, die durch mehrfaches Waschen in 0,5 M KCL hoch gereinigt worden war. Danach enthält die RNP-Fraktion einen höheren Anteil an monomeren Partikeln, während der Anteil an messenger-Ribosomen-Komplexen oder aggregierten Ribosomen geringer ist.

In Abbildung 3 ist ein Dichtegradientenprofil nach Präzipitation der Leber-RNP mittels hoher Mg^{++}-Konzentration dargestellt. Danach ergibt sich bei dieser Isolierungstechnik ein höherer Anteil an messenger-Ribosomen-Komplexen bzw. an aggregierten Ribosomen im Vergleich zu den Partikeln, die durch Zentrifugation der postmitochondrialen Überstände durch den diskontinuierlichen Saccharosegradienten isoliert wurden.

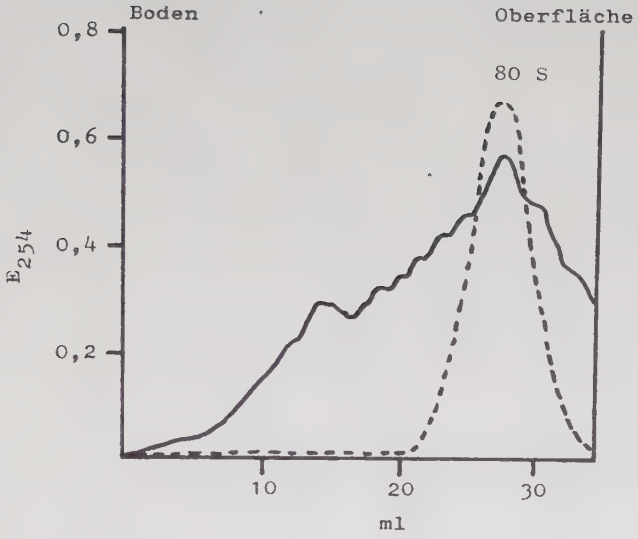

Abb. 2: UV-Absorptionsprofil einer RNP-Fraktion aus Leber nach Isolierung über 2 M Saccharose; linearer Gradient 15 % - 40 %, Auftragung 20 A_{260} RNP, Zentrifugation für 2 h im Sorvall SW-Rotor 6 x 38 bei 100 000 x g

----- UV-Absorptionsprofil unter Verwendung von monomeren 80 S Leber-Ribosomen

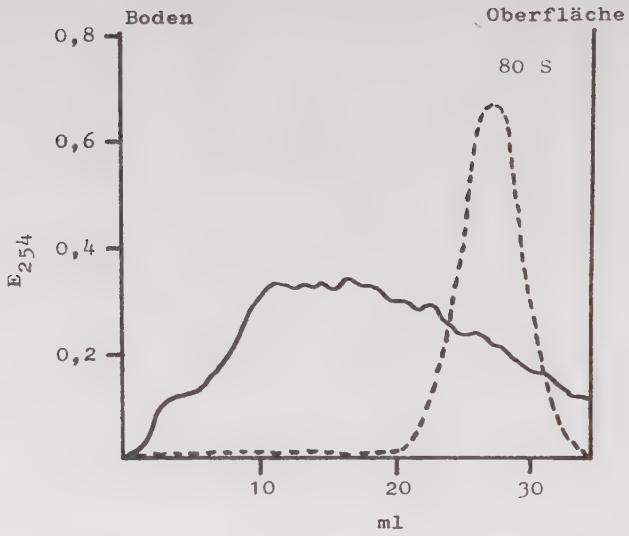

Abb. 3: UV-Absorptionsprofil einer RNP-Fraktion aus Leber nach Isolierung mittels Mg^{++}-Präzipitation; linearer Gradient 15 % - 40 %, Auftragung 20 A_{260} RNP, Zentrifugation für 2 h im Sorvall SW-Rotor 6 x 38 bei 100 000 x g

----- UV-Absorptionsprofil unter Verwendung von monomeren 80 S Leber-Ribosomen

4.2.2. Gehalt der Gewebe an extrahierbaren messenger-Ribosomen-Komplexen

Der Gehalt an extrahierbaren freien und membrangebundenen messenger-Ribosomen-Komplexen aus Großhirn- und Lebergewebe ist in Tabelle 5 dargestellt. Danach ist der Gehalt an extrahierbaren freien und membrangebundenen messenger-Ribosomen-Komplexen aus Großhirngewebe der 5 Tage und 10 Tage Alkoholentzugsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen nicht signifikant bzw. garnicht erniedrigt. Der Gehalt an extrahierbaren Gesamtpolysomen aus Lebergewebe der 5 und 10 Tage Alkoholentzugsgruppen ist nicht signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht bzw. erniedrigt.

Tabelle 5 : Einfluß des Alkoholentzuges auf den Polysomengehalt in Großhirn und Leber der Ratten

Entzug	Gewebe	Partikel	Gehalt an extrahierbaren messenger-Ribosomen-Komplexen	
			Kontrollen (A_{260}/gr FG)	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	freie Polysomen	7,3 ± 1,2	100
		membrangebundene Polysomen	3,6 ± 0.7	100
	Leber	Gesamt-Polysomen	131,0 ± 12,0	95
10 Tage	Großhirn	freie Polysomen	8,0 ± 0,8	89
		membrangebundene Polysomen	3,3 ± 1,3	93
	Leber	Gesamt-Polysomen	116,0 ± 9,5	103

$\bar{x} \pm SD$; n = 3

4.2.3. Biologische Eigenschaften der Polysomen in den zellfreien Systemen

1. Optimierungsexperimente

Eine Reihe von Vorexperimenten diente dazu, die optimalen Bedingungen für den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den polysomalen Systemen zu ermitteln. Die Abhängigkeit der Inkorporation markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein durch Polysomen von der Inkubationsdauer ist in Abbildung 4 dargestellt. Danach steigt die Inkorporation von markierten Aminosäuren innerhalb der ersten 30 min steil an und erreicht ein Maximum nach 50 min. Im weiteren Versuchsablauf bleibt die Einbaurate konstant.

Die Abhängigkeit der Inkorporation von der Polysomenkonzentration ist der folgenden Abbildung 5 zu entnehmen. Der Einbau der markierten Aminosäuren hängt linear von der Konzentration der eingesetzten Ribosomen ab. Die Menge der messenger-Ribosomen-Komplexe ist also limitierend. Eine Sättigung des Systems mit Polysomen wurde nicht angestrebt, da zum einem nur ein begrenztes Volumen der Polysomenlösung in den Testeinsatz eingesetzt werden konnte und zum anderen mit dem isolierten Material sparsam umgegangen werden

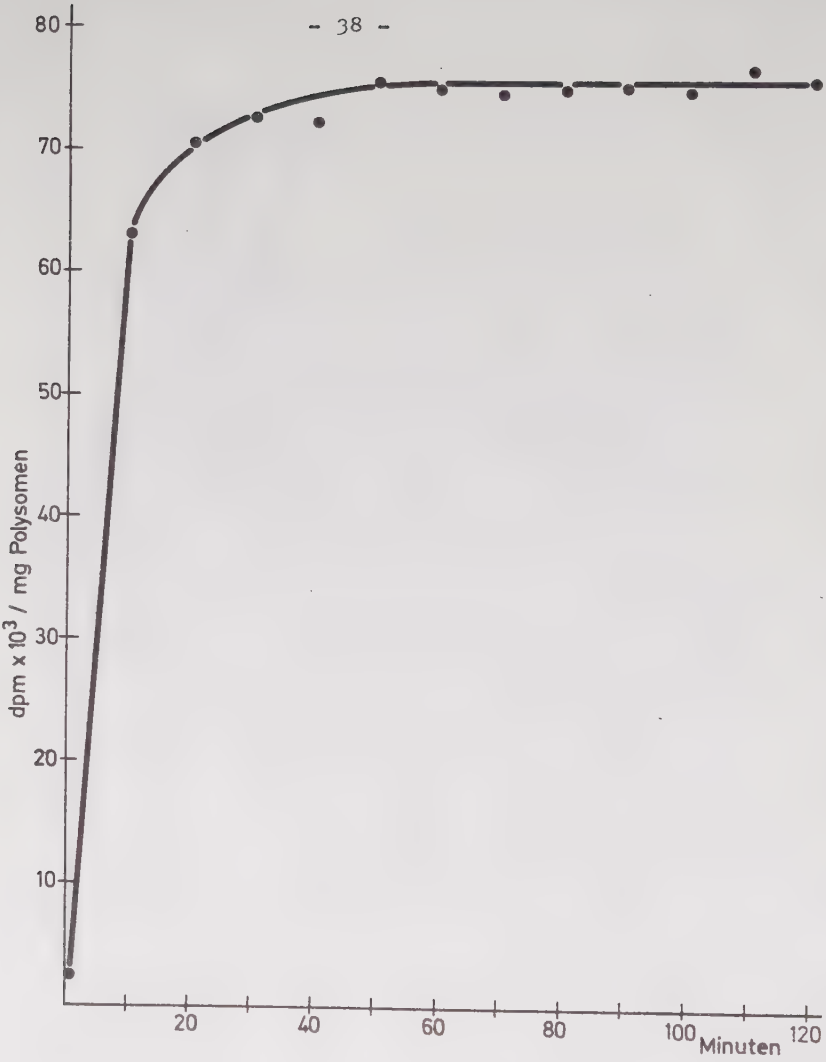

Abb. 4 : Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im zellfreien System mit Polysomen aus Großhirngewebe : Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

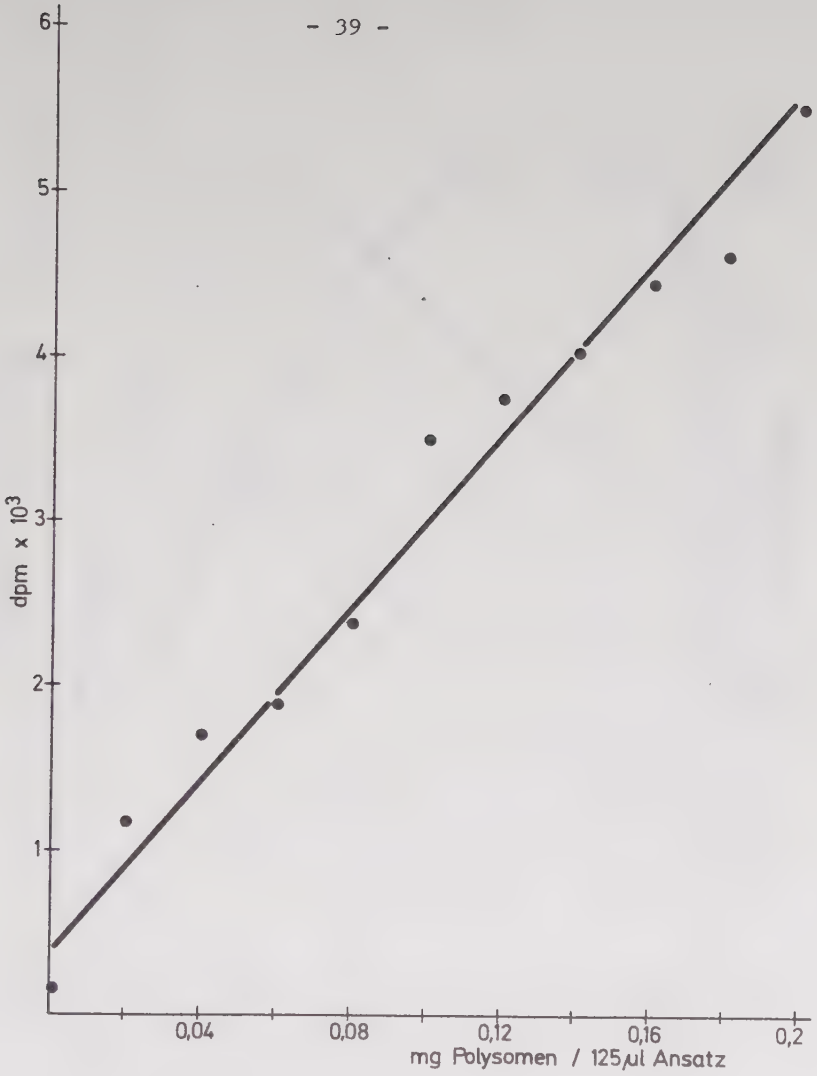

Abb. 5 : Einbaurate markierter Aminosäuren in säure-fällbares Protein im polysomalen System : Abhängigkeit von der Polysomenkonzentration aus Großhirngewebe

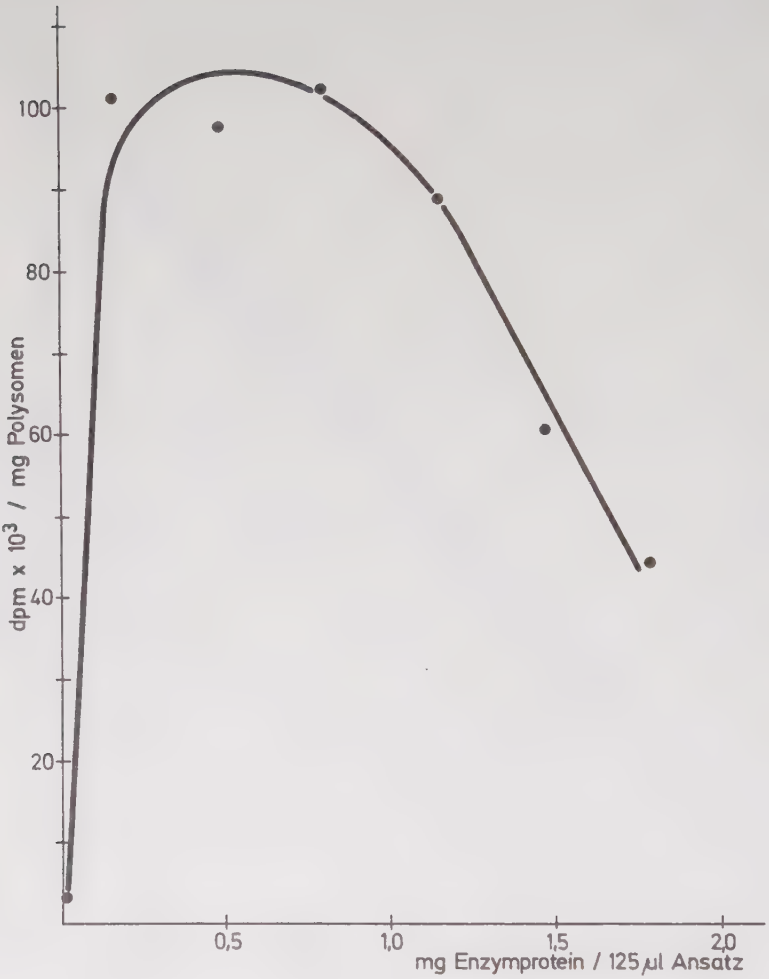

Abb. 6 : Einbaurate radioaktiv markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen System mit Polysomen aus Großhirngewebe : Abhängigkeit von der Konzentration löslicher Enzyme

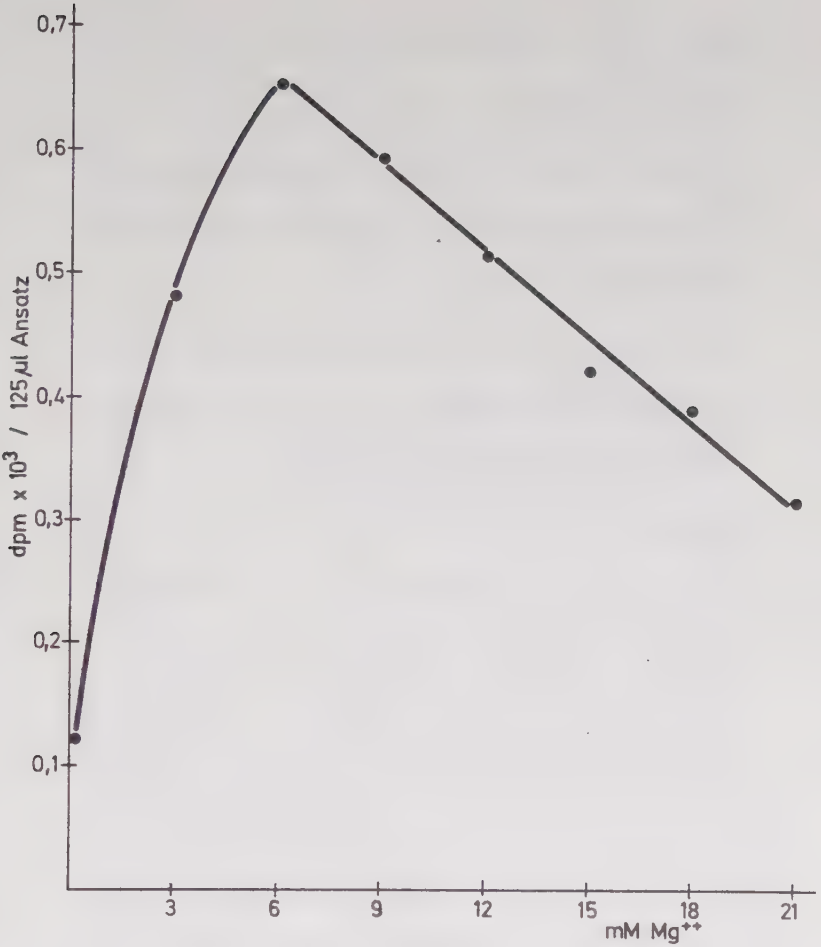

Abb. 7 : Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen System mit Polysomen aus Großhirngewebe : Abhängigkeit von der Magnesiumionen-Konzentration

mußte. Daher wurde 1,25 A_{260} Polysomen aus Lebergewebe oder 1 A_{260} Polysomen aus Cortexgewebe dem Testsystem zugesetzt. Die Abhängigkeit der Inkorporation von markierten Aminosäuren von der Konzentration löslicher Enzyme in den Testansätzen ist in Abbildung 6 dargestellt. Danach besteht ein deutliches Maximum bei einer Konzentration löslicher Enzyme von 0,2 mg bis 1,2 mg pro 125 µl Ansatz. Eine weitere Erhöhung der löslichen Enzymfraktion führt zu einer massiven Hemmung der Inkorporation von markierten Aminosäuren.

In der folgenden Abbildung 7 ist die Abhängigkeit der Inkorporation von markierten Aminosäuren von der Magnesiumkonzentration dargestellt. Der Einbau von markierten Aminosäuren in säurefällbares Protein ist bei einer Magnesiumkonzentration von 6 mMol maximal; eine Erniedrigung bzw. Erhöhung der Magnesiumkonzentration hat ein Absinken der Einbaurate zur Folge.

Der Zusatz "exogener" t-RNA zu den Testansätzen steigerte die Inkorporation radioaktiv markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den polysomalen Systemen nicht. Dieses kann erklärt werden durch den hohen Gehalt der Polysomenfraktionen an "endogener" t-RNA, die sowohl nach Mg^{++}-Präzipitation als auch nach

Zentrifugation durch 2 M Saccharose an die Polysomen gebunden ist.

Ein optimiertes polysomales System aus Großhirngewebe war danach durch die in Tabelle 6 angegebenen Eigenschaften charakterisiert.

Tabelle 6: Eigenschaften der polysomalen Systeme

	Einbaurate markierter Aminosäuren dpm x 125 µl Ansatz^{-1} x h^{-1}	
Komplett	3953	(100 %)
- t-RNA	3970	(100 %)
- S-100	321	(8 %)
- RNP/S-100	161	(4 %)

2. Vergleich der Aminosäuren inkorporierenden Aktivitäten der Polysomen

Die Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den Systemen mit Polysomen aus den verschiedenen Versuchsgruppen sind vergleichend in der Tabelle 7 dargestellt. Die Aminosäuren inkorporierenden Aktivitäten der Polysomen aus Großhirngewebe der beiden Entzugsgruppen sind danach sowohl bei den freien als

Tabelle 7 : Einfluß des Alkoholentzugs auf die biologischen Aktivitäten der Polysomen aus Großhirn-und Lebergewebe der Ratten

Entzug	Gewebe	Partikel	Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein	
			Kontrollen (dpm x $mg_{Polysomen}^{-1}$ x h^{-1})	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	freie Polysomen	114925 ± 20346	115
		membrangebundene Polysomen	109465 ± 22860	121
	Leber	Gesamt-Polysomen	33205 ± 1972	103
10 Tage	Großhirn	freie Polysomen	155203 ± 21627	106
		membrangebundene Polysomen	143563 ± 23384	134
	Leber	Gesamt-Polysomen	32125 ± 2885	104

$\bar{x}$ ± SD; n = 3

auch bei den membrangebundenen messenger-Ribosomen Komplexen gegenüber den Kontrollgruppen nur leicht, aber nicht signifikant, erhöht. Ebenso sind die Aminosäuren inkorporierenden Aktivitäten der Gesamtpolysomen aus Lebergewebe der beiden Alkoholentzugsgruppen gegenüber den Kontrollen nicht signifikant erhöht.

4.3. S-100 Enzyme

4.3.1. Gehalt der Gewebe an löslichen Enzymen

Eingesetzt wurden in die polysomalen Systeme die Überstände bei 100.000 x g (S-100) nach chromatographischer Reinigung über Sephadex G 25. In Tabelle 8 ist der Gehalt der untersuchten Gewebe an der Fraktion löslicher Proteine für die verschiedenen Versuchsgruppen zusammengefaßt. Danach ist der Gehalt an löslichen Enzymen aus Großhirngewebe der 5 Tage alten Entzugstiere gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht. Der Gehalt an löslichen Enzymen aus Lebergewebe der 5 Tage Entzugstiere unterscheidet sich gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls nicht. Der Gehalt an löslichen Enzymen aus Großhirn- und Lebergewebe der 10 Tage Entzugsgruppe ist gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.

Tabelle 8: Einfluß des Alkoholentzugs auf den Gehalt des Großhirn- und Lebergewebes an löslichen Enzymen

Entzug	Gewebe	Gehalt an löslichen Enzymen	
		Kontrolle (mg/gr FG)	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	19,7 ± 1,6	104
	Leber	63,6 ± 6,0	101
10 Tage	Großhirn	18,9 ± 0,9	100
	Leber	54,9 ± 2,9	101

$\bar{x} \pm SD$; n = 4

4.3.2. Vergleich der biologischen Aktivitäten der löslichen Enzyme

Die biologischen Aktivitäten der einzelnen Enzymfraktionen wurden in zellfreien Systemen mit Standardpolysomen gemessen. Die folgende Tabelle 9 faßt die Einbauraten markierter Aminosäuren in dem polysomalen System mit den Enzymfraktionen aus den verschiedenen Versuchsgruppen zusammen. Danach sind die biologischen Aktivitäten der löslichen Enzymfraktionen aus Großhirn- und Lebergewebe der 5 Tage und 10 Tage Entzugstiere nicht signifikant gegenüber den Kontrollgruppen erhöht. Die erhöhten biologischen Aktivitäten der einzelnen Enzymfraktionen aus Großhirn- und Lebergewebe der Entzugstiere sind ebenfalls nicht signifikant erhöht.

Tabelle 9: Einfluß des Alkoholentzugs auf die biologischen Aktivitäten der löslichen Enzymfraktionen aus Großhirn- und Lebergewebe der Ratten

Entzug	Gewebe	Einbaurate markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein	
		Kontrollen (dpm x mg Polysomen^{-1} x h^{-1})	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	67.485 ± 24.528	103
	Leber	34.941 ± 2.621	104
10 Tage	Großhirn	59.902 ± 14.287	102
	Leber	24.373 ± 683	109

$\bar{x}$ ± SD; n = 3

4.4. t-RNA

4.4.1. Gehalt der Gewebe an isolierbarer t-RNA

Die Phenolextraktion der t-RNA aus Großhirn- und Lebergewebe ergab Ausbeuten, die für die verschiedenen Gruppen in Tabelle 10 zusammengefaßt sind. Danach sind die Ausbeuten an extrahierbarer t-RNA aus Großhirn- und Lebergewebe der 5 Tage und 10 Tage Entzugstiere gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Da die erhöhten Werte innerhalb der jeweiligen Standardabweichung liegen, ergibt sich keine Signifikanz.

Tabelle 10: Einfluß des Alkoholentzuges auf die Menge extrahierbarer t-RNA aus Großhirngewebe und Lebergewebe der Ratten

Entzug	Gewebe	Menge an extrahierbarer t-RNA	
		Kontrolle (A_{260}/gr FG)	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	4,2 ± 0,5	110
	Leber	12,0 ± 0,5	105
10 Tage	Großhirn	4,3 ± 1,0	117
	Leber	11,5 ± 0,6	110

$\bar{x}$ ± SD; n = 3

4.4.2. Biologische Eigenschaften der t-RNA

1. Optimierung der Standardsysteme zur Aminoacylierung der t-RNA

Die Messung der biologischen Eigenschaften einzelner spezifischer t-RNA im Gesamt t-RNA-Gemisch aus Großhirn- und Lebergewebe in polysomalen Systemen ist nicht sinnvoll, da die Polysomenfraktionen einen hohen Anteil an "endogener", also assoziierter t-RNA enthält, wie aus Tabelle 6 hervorgeht. Daher wurden die biologischen Eigenschaften der t-RNA in Standardsystemen untersucht, die ausschließlich die Aminoacylierung der spezifischen t-RNA mit den dazugehörigen Aminosäuren im Gemisch der Gesamt-t-RNA aus Großhirn- und Lebergewebe erfassen. Zur Optimierung dieser Standardsysteme der Aminoacylierung wurden in einer Reihe von Vorexperimenten beispielhaft die experimentellen Bedingungen für die in vitro Beladung der t-RNA^{Leu} aus Großhirngewebe untersucht.

Die Abbildung 8 zeigt die Abhängigkeit der Beladung der t-RNA^{Leu} von der Inkubationsdauer. Danach steigt die Aminoacylierung dieser t-RNA in den ersten 20 min linear an, erreicht nach 30 min ihr Maximum und bleibt bis zum Ende des Ver-

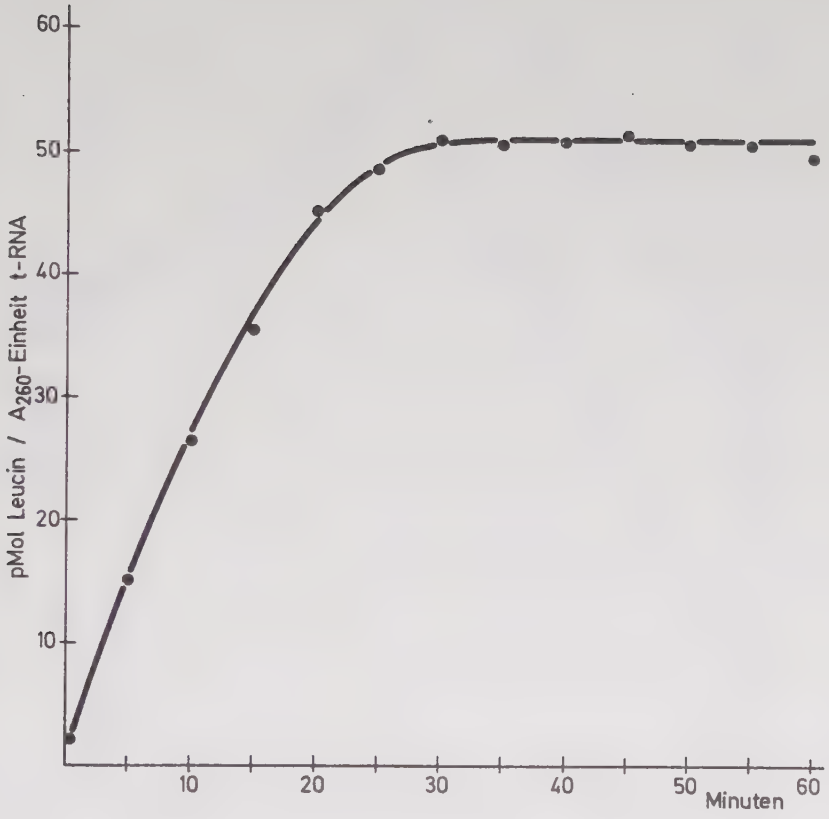

Abb 8 : Beladung der t-RNA^{Leu} aus Großhirngewebe
in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

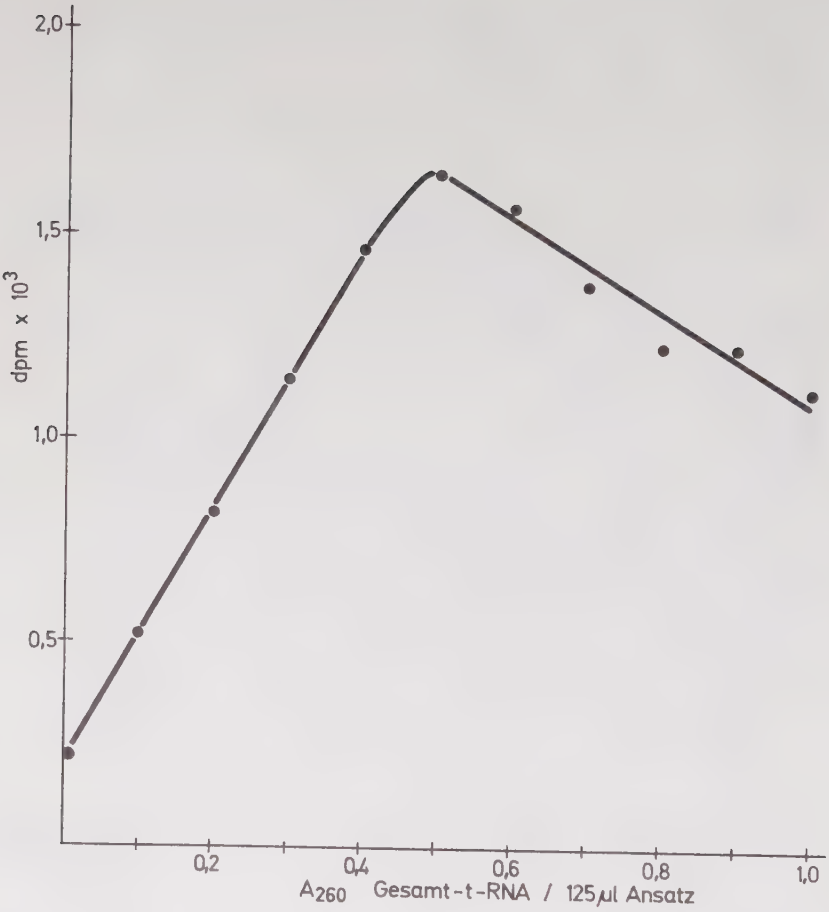

Abb. 9 : Beladung der t-RNA^{Leu} aus Großhirngewebe in Abhängigkeit von der Konzentration der Gesamt-t-RNA
Entnahme der Proben nach 30 min

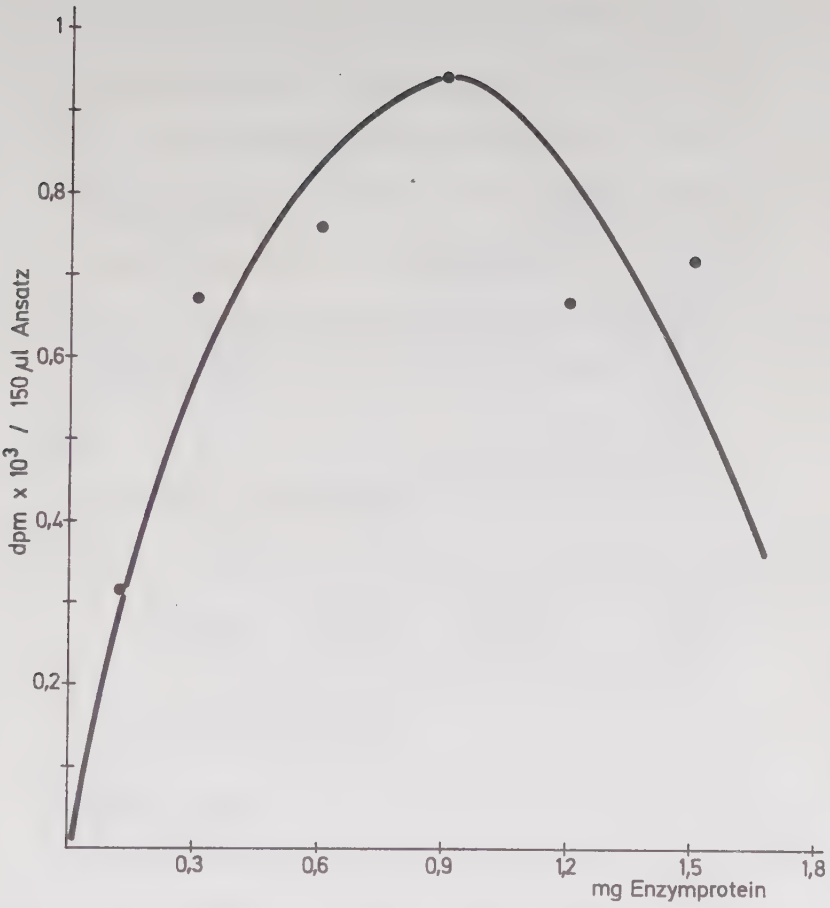

Abb. 10 : Beladung der t-RNA^{Leu} aus Großhirngewebe in Abhängigkeit von der Konzentration der löslichen Enzyme
Entnahme der Proben nach 30 min

suches annähernd gleich. Die Abbildung 9 zeigt die Beladung der t-RNA^{Leu} in Abhängigkeit von der Konzentration des Gesamt-t-RNA-Gemisches im Testansatz. Die Aminoacylierung steigt danach bis 0,4 A_{260} linear an und erreicht ihr Maximum bei 0,5 A_{260} t-RNA. Eine weitere Erhöhung der t-RNA Konzentration führt zu einer Abnahme der in vitro-Beladung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden jeweils 0,5 A_{260} t-RNA in den Testansätzen eingesetzt. In der Abbildung 10 ist die Abhängigkeit der Beladung der t-RNA^{Leu} bei Einsatz von etwa 1 mg S-100 Protein in die Testansätze (150 µl) am höchsten. Eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration führt zu einer drastischen Abnahme der Aminoacylierung der t-RNA^{Leu}.

2. Vergleich der biologischen Aktivitäten der t-RNA

Zur Messung der biologischen Eigenschaften der t-RNA aus Großhirn- und Lebergewebe der verschiedenen Versuchsgruppen wurde die Akzeptoraktivität einzelner spezifischer t-RNA's im Gesamtgemisch der t-RNA aus Großhirn- und Lebergewebe für die zugehörigen Aminosäuren geprüft.

In der folgenden Tabelle 11 ist die Beladung der t-RNA^{Leu}, t-RNA^{Lys}, t-RNA^{Phe} und der t-RNA^{Met} mit ihren spezifischen Aminosäuren im t-RNA-Ge-

Tabelle 11: Einfluß des Alkoholentzugs auf die Aminoacylierung der t-RNA^{Leu}, t-RNA^{Lys}, t-RNA^{Phe} und t-RNA^{Met} im t-RNA-Gesamtgemisch aus Großhirn- und Lebergewebe der Ratten

Entzug	Gewebe	AS	Aminoacylierung^{+}	
			Kontrolle p Mol AS/ A_{260} t-RNA	Entzug (% der Kontrollen)
5 Tage	Großhirn	Leu	41,6 ± 0,8	98
		Lys	21,7 ± 8,2	92
		Phe	25,8 ± 10,9	104
		Met	33,9 ± 12,8	107
	Leber	Leu	18,1 ± 7,1	106
		Lys	4,3 ± 1,7	111
		Phe	8,5 ± 3,5	98
		Met	8,3 ± 3,3	100
10 Tage	Großhirn	Leu	37,7 ± 10,7	102
		Lys	25,9 ± 5,7	95
		Phe	26,2 ± 4,6	98
		Met	36,8 ± 8,7	97
	Leber	Leu	18,5 ± 5,2	115
		Lys	4,7 ± 1,6	123
		Phe	8,9 ± 1,9	108
		Met	7,9 ± 1,6	118

$\bar{x}$ ± SD; n = 3; $^{+}$Maximalbeladung nach 30 min Inkubation

samtgemisch der verschiedenen Versuchsgruppen zusammengefaßt. Danach ergibt sich keine signifikante Erhöhung bzw. Erniedrigung der Akzeptoraktivität dieser t-RNA's aus Großhirn- und Lebergewebe der einzelnen Entzugsgruppen gegenüber ihren Kontrollgruppen, da die erhöhten bzw. erniedrigten Werte jeweils innerhalb der Standardabweichung der Kontrollen liegen.

5. Diskussion

Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob in der Entzugsphase nach chronischer Alkoholintoxikation in Rattenhirn und Rattenleber Störungen des Mechanismus der Proteinsynthese nachweisbar sind, die mit der Wirkung der Substanz selbst oder ihrer Metabolite erklärt werden können. Dazu wurde einer Gruppe von weiblichen Ratten über 20 Wochen eine 10 %ige Alkohollösung in keimfreiem Wasser als einzige Trinkflüssigkeit verabreicht.

Eine so langfristige Verabreichung des Alkohols zur Erzielung einer chronischen Intoxikation ist wegen des aversiven Geschmacks der Versuchstiere gegenüber der Substanz mit erheblichen Problemen behaftet. Im Prinzip werden dabei drei Verfahren besonders häufig verwendet:

- Magenintubation
- Flüssigkeitsdiäten
- Trinklösungen

Die Methode der Magenintubation zur Applikation von Alkohollösungen wurde von Majchrowicz (25) zum ersten Mal 1973 bei Ratten durchgeführt. Dabei wurde den Ratten 3 - 5 mal täglich über 1 - 12 Tage eine Magensonde gelegt, durch die eine 20 %ige Alkohollösung (12 - 15 gr/kg Kör-

pergewicht) instilliert wurde. Hunt (26) intubierte die Ratten nur 2 -3 mal täglich über 7 Tage und instillierte die gleichen Mengen Äthanol wie Majchrowicz (25). Es wurde berichtet, daß bei dieser Methode sehr hohe Blutalkoholspiegel bis zu 6,4 ‰ erreicht wurden. Die Tiere zeigten während dieses Versuches Verlust der normalen Reflexe, Tremor, Ataxien und Koma. Unter Entzug traten Tremor, Spastik und spontane Krampfanfälle bereits nach 3 - 5 Tage dauernder Alkoholintoxikation auf (25).
Auch wenn bei dieser Methode als Vorteil anzusehen ist, daß bei den Ratten hohe Alkoholspiegel zu erreichen sind und die applizierte Alkoholmenge konstant ist, so ergeben sich auf der anderen Seite gravierende Nachteile! Um den Tieren eine Magensonde zu legen, war jeweils eine kurze Äthernarkose erforderlich. Die Beeinflussung des Proteinstoffwechsels der Leber- und Hirnzellen durch die häufige Gabe des Äthers stellt jedoch eine nicht zu berechnende Variable dar.
Ein weiteres Problem ist, daß die orale Intubationsmethode sich nicht längerfristig anwenden läßt, da bereits nach kurzer Zeit schwere Magen-Darm-Ulcera nachweisbar sind (27).

Die Technik der Fütterung mittels Flüssigkeitsdiäten wurde bereits 1917 von Mitchell et

al (28) in Tierversuchen angewandt. Lieber et al (29) benutzten schließlich 1963 die Flüssigkeitsdiät, um Ratten Alkohol zu verabreichen. Diese Diät setzte sich zu 36 % der Kalorien aus Alkohol, zu 45 % aus Oliven- und Weizenöl sowie zu 15 % aus Aminosäuren zusammen. Verhaltensänderungen aufgrund der chronischen Intoxikation sowie Entzugszeichen wurden bei dieser Diät nicht berichtet.

Nach einer alkoholhaltigen Flüssigdiät (30), die an Stelle von freien Aminosäuren Maltose und Kasein enthielt, konnten andere Autoren jedoch bei Sprague Dawley Ratten audiogen das Auftreten von Krämpfen indizieren.

"Entzugssymptome" bei Nagetieren wurden erstmals bei Mäusen beschrieben. Diese Labortiere erhielten eine Flüssigkeitsdiät, welche im wesentlichen aus kondensierter Milch, Vitamien und Mineralien sowie zu 35 % der Kalorien aus Alkohol bestand (Metrical-Shape$^{(R)}$, Mead Johnson and Company, Evansville, Indiana). Während der Gewichtszunahme traten bei den Mäusen sowohl unter der Alkoholdiät als auch während des Entzuges gelegentlich und spontan Krämpfe und Tremor auf (31, 32, 33).

Um die Reproduzierbarkeit des Auftretens dieser als "Entzugssymptome" gedeuteten Störungen zu ver-

größern, wurde das Körpergewicht der Mäuse vor Beginn der Fütterung mit der oben beschriebenen Alkoholfüssigkeitsdiät reduziert (31, 32, 34). Durch diese Maßnahme traten Tremor und Krämpfe unter Alkoholentzug bei den Versuchstieren gehäuft auf.

Auch bei Ratten wurden von Branchey et al (35) nach einer Gewichtsreduktion auf 66 % ihres Ausgangsgewichtes und anschließender Fütterung über 3 Wochen mit einer Metrical-Diät nach Entzug des Alkohols Tremor und spontane, nicht tödliche Krämpfe beobachtet. Hunter berichtete ebenfalls, daß bei Ratten, deren Gewicht auf 75 % ihres Ausgangsgewichtes reduziert worden war und die anschließend mit einer Metrical-Diät mit einem ansteigenden Anteil Alkohol, der 35 - 40 % der Gesamtkalorien betrug, gefüttert worden waren, Entzugszeichen nach Entfernung des Alkohols auftraten. Bei allen Tieren wurde Tremor, aber keine spontanen Krämpfe beobachtet. Audiogene Reize lösten jedoch bei sechs von sieben Ratten tonisch-klonische Krämpfe aus (36).

Die unterschiedlichen Beobachtungen der einzelnen Untersucher zeigen, daß die Anwendung der Flüssigkeitsdiäten zur Applikation von Alkohol bei Ratten keine einheitlichen Ergebnisse liefern. Mit der Technik der Flüssigkeitsdiäten können

zwar im Gegensatz zur Magenintubation gleichzeitig eine große Anzahl von Tieren gefüttert und hohe Blutalkoholspiegel erreicht werden, ihr entscheidender Nachteil jedoch ist die Beschränkung der Nahrungszufuhr (31). So konnte gezeigt werden, daß die verringerte Nahrungsaufnahme allein unabhängig von jedweder Alkoholwirkung ebenso zu audiogen auslösbaren Krämpfen bei Ratten führen kann (37).
Auch andere Untersucher weisen auf die Schwierigkeit hin zu entscheiden, ob die beobachteten "Entzugssymptome" nur duch den Hunger bedingt sind, oder aber direkt duch den Alkohol in der Flüssigkeitsdiät hervorgerufen werden (38,39). Insbesondere vertritt Cicero (40) die Auffassung, daß aufgrund der genannten Probleme die Anwendung von Flüssigkeitsdiäten zur Untersuchung der biochemischen und verhaltensbedingten Veränderungen, hervorgerufen durch Alkohol, nicht geeignet seien. Ein weiterer Nachteil dieser Technik ist im übrigen, daß die Ratten während der Versuchsdauer in Einzelkäfigen isoliert gehalten werden mußten, um zu gewährleisten, daß sie nur die jeweils bestimmte Menge an Flüssigkeitsdiät zu sich nehmen konnten. Es ist nicht zu übersehen, daß eine solche soziale Deprivation der Tiere eine weitere Ursache für das Auftreten von pathologischen Symp-

tomen darstellt. Dieses wird unterstützt durch Beobachtungen an Ratten, die nach Isolierung häufiger mit Verhaltensanomalien reagierten, als Ratten, die in Gruppen gehalten wurden (41).

Die einfachste Methode der langfristigen Alkoholgabe bei Ratten ist die ausschließliche Verabreichung von Alkohollösungen als Trinkflüssigkeit. Aus den dargelegten Gründen haben wir uns entschlossen, den Ratten eine Alkohollösung zu geben, der zur Maskierung des aversiven Geschmacks 2 % Zucker zugesetzt worden war. Zusätzlich wurden die Ratten zu 5 Tieren in einem Käfig gehalten und erhielten sowohl die Standarddiät als auch die Trinklösung ad libitum. Geht man davon aus, daß unter dieser Versuchsanordnung jede Ratte pro Tag 25 - 35 ml dieser Trinklösung zu sich nahm, so entspricht das einer Aufnahme von 10 - 14 gr Alkohol/kg Körpergewicht/Tag (42, 43). Im Verlauf des 20 Wochen dauernden Versuches nahmen die Tiere der Kontrollgruppe als auch der Alkoholgruppe gleichermaßen zu. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Tiere nicht mangelernährt wurden.

Auch bei orientierender Beobachtung des Verhaltens der Tiere unter Alkoholeinfluß und Alkoholentzug konnten keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren beobachtet werden. Die

Messung des Explorationsverhaltens mit Hilfe des "hole-board's" (9) ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren.

Zu den gleichen Ergebnissen kommt Ratcliffe (44), der jungen Ratten Trinklösungen in unterschiedlicher Konzentration von 2,5 - 25 % über 7 Wochen verabreichte. Während der Trinkperiode wurden bei den Tieren weder Tremor, noch spontane Krämpfe oder audiogen auslösbare Krämpfe beobachtet. Auch während des Entzuges wurden diese Symptome nicht festgestellt.

Diese fehlenden Unterschiede in Gewicht und Verhalten lassen auch keine massiven biochemischen Veränderungen in Leber- und Hirnzellen erwarten. Dementsprechend fanden wir, daß weder der Gehalt der Gewebe an extrahierbaren messenger-Ribosomen-Komplexen noch die biologischen Eigenschaften der Polysomen in den zellfreien Systemen gegenüber denen der Kontrolltiere sich signifikant unterschieden. Lediglich die biologischen Aktivitäten der membrangebundenen Polysomen aus Großhirngewebe der Alkoholgruppen waren gegenüber den Kontrollen leicht, aber nicht signifikant erhöht. Auch der Gehalt der Gewebe an löslichen Enzymen und ihre biologischen Aktivitäten wiesen keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Der Gehalt

der Gewebe an isolierbarer t-RNA zeigte keine signifikanten Unterschiede. Auch die Aminoacylierung spezifischer t-RNA-Moleküle ergab ebenfalls keine signifikanten Veränderungen gegenüber denen der Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Reihe von Befunden anderer Autoren. So beschreiben Tewari et al (8) bei Ratten, denen Alkohollösungen mittels Magenintubation über mehrere Tage oral verabreicht worden waren, eine erniedrigte Proteinsynthese im Gehirn nach 24 stündigem Entzug der Substanz. Die Bestimmung des Proteingehaltes der Ribosomen ergab eine signifikante Erniedrigung während der Alkoholapplikation und einen erhöhten Gehalt während der Entzugsphase. Auch Møreland (6) beobachtete unter ähnlichen Bedingungen eine Abnahme des Einbaus von Aminosäuren in isolierten Leberzellen. Dagegen ergaben Untersuchungen von Jarlstedt (5) an Ratten, denen über 8 Monate eine 15 %ige Alkohollösung ad libitum verabreicht wurde, eine leichte Steigerung des Einbaus von Leuzin in Protein aus Hirn- und Lebergewebe.

Die Widersprüchlichkeit der von verschiedenen Autoren erhobenen Befunde zeigt die offensichtliche Schwierigkeit, ein geeignetes tierexperimentelles Modell zu finden, welches es gestattet, biochemische Aspekte des Alkoholismus zu unter-

suchen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde dabei besonderer Wert daurauf gelegt, zumindestens den schwerwiegenden Nachteil einer reduzierten Nahrungszufuhr als Bestandteil der experimentellen Methoden zu umgehen. Unter den von uns gewählten Bedingungen konnten nach Beendigung einer 20 wöchigen Trinkperiode die von anderen Autoren beschriebenen Änderungen der biochemischen Aktivitäten des Protein synthetisierenden Apparates nicht bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Nach 5 und 10 Tage dauerndem Alkoholentzug wurden sowohl das Verhalten von weiblichen Wistar-Ratten als auch der Protein synthetisierende Apparat in Gehirn und Leber dieser Tiere untersucht. Die Versuchstiere hatten vor der Entzugsperiode über einen Zeitraum von 20 Wochen anstelle des Trinkwassers eine 10 %ige Alkohollösung + 2 % Saccharose zur Überwindung des aversiven Geschmacks gegenüber der Substanz verabreicht bekommen.
Im Verlauf des gesamten Experiments nahmen die Tiere der einzelnen Versuchsgruppen an Gewicht gleichermaßen zu. Signifikante Unterschiede im Gesamtverhalten der Tiere innerhalb der Versuchsgruppen konnten beim Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen nicht festgestellt werden. Auch die Messung des Explorationsverhaltens mit dem "hole-board" ergab keinen deutlichen Unterschied. Nach fraktionierter Zentrifugation von Gehirn und Leber waren der Gehalt der Gewebe an extrahierbaren messenger-Ribosomen-Komplexen als auch die Einbauraten markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein in den polysomalen Systemen der Proteinsynthese in den einzelnen Versuchsgruppen nicht unterschiedlich. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Bestimmung des Gehaltes der Gewebe an

löslichen Enzymen und ihren biologischen Aktivitäten. Die Menge extrahierbarer t-RNA in Gehirn und Leber und die Aminoacylierung spezifischer t-RNA-Moleküle zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen bei Alkoholentzug nach 20wöchiger chronischer Intoxikation der Tiere im Vergleich zu den Kontrollen weder im Verhalten noch in dem Protein synthetisierenden Apparat signifikante Unterschiede auftreten.

Herrn Priv. Doz. Dr. med B. Goertz danke ich für die Überlassung des Themas und für seine hilfreiche Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

7. Literaturverzeichnis

(1) E.W. Fleming, S. Tewari und E.P. Noble
Effects of chronic ethanol ingestion on brain aminoacyl-t-RNA synthetases and t-RNA
J. Neurochem. (1975) 24, 553 - 560

(2) S. Tewari, E.W. Fleming und E.P. Noble
Alterations in brain RNA metabolism following chronic ethanol ingestion
J. Neurochem. (1975) 24, 561 - 569

(3) J.A. Khawaja, D.B. Lindholm und J. Niittylä
Selective inhibition of protein synthetic activity of cerebral membrane-bound ribosomes as a consequence of ethanol ingestion
Research Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. (1978) 19, No 1

(4) J. Ellingboe
Effects of alcohol on neurochemical processes
In: Psychopharmacology: A generation of progress
M.A. Lipton, A. DiMascio und K.F. Killam (eds)
Raven Press, New York (1978)

(5) J. Jarlstedt
Experimental alcoholism in rats: Protein synthesis in subcellular fractions from cerebellum, cerebral cortex and liver after long term treatment
J. Neurochem (1972) 19, 603 - 608

(6) J. Mørland und A. Bessesn
Inhibition of protein syntheses by ethanol in isolated rat liver parenchymal cells
Biochem. Biophys. Acta (1977) 474, 312 - 320

(7) E. Barona und C.S. Lieber
Effects of ethanol on hepatic protein synthesis and secretion
In: Currents in Alcoholism
F.A. Seixas (ed)
Grune and Stratton, Inc, New York (1977)
Vol 1

(8) S. Tewari, M.A. Goldstein und E.P. Noble
Alterations in cell free brain protein synthesis following ethanol withdrawal in physically dependent rats
Brain Research (1977) 126, 509 - 518

(9) J.R. Boissier, P. Simon und J.M. Lwolff
L'utilisation d'une réaction particulière de la Souris (Methode de la planche a trous) pour l'étude des medicaments psychotropes
Thérapie (1964) 19, 571 - 589

(10) L. Valzelli
The exploratory behaviour in normal and agressive mice
Psychopharmacologia (Berl.) (1969) 15, 232 - 235

(11) F.O. Wettstein, T. Staehelin und H. Noll
Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis: Characterization of the ergosome
Nature (1963) 197, 430 - 435

(12) A. J. Munro, R.J. Jackson und A. Korner
Studies on the nature of polysomes
Biochem. J. (1964) 92, 289

(13) M.P. Lerner, F.O. Wettstein, H.R. Herschmann J.G. Stevens und B.R. Fridlender
Distribution of polysomes in mouse brain tissue
J. Neurochem. (1971) 18, 1495 - 1507

(14) H. Noll, T. Staehelin und F.O. Wettstein
Ribosomal aggregates engaged in protein sythesis:
Ergosome breakdown and messenger ribonucleic acid transport
Nature (1963) 198, 632 - 638

(15) J.D. Watson
Molekularbiologie des Gens
2. Ausgabe, Inter European Editions, Amsterdam (1975)

(16) R.D. Palmiter
Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes
Expedient techniques for the isolation of undegraded polysomes and messenger ribonucleic acid
Biochemistry (1974) 13, No 17, 3606 - 3615

(17) C.E. Zomzely-Neurath
Cerebral protein synthesizing systems
In: Protein biosynthesis in nonbacterial systems
J.A. Last, A.J. Laskin (eds)
Marcel Dekker Inc, New York (1972) 147 - 187

(18) J. Mansbridge und A. Korner
An anomaly in the time course of incorporation of amino acids into soluble ribonucleic acid
Biochem. J. (1963) 89, 15 P

(19) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randell
Protein measurement with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem (1951) 193, 265

(20) U. Wiegers und H. Hilz
A new method using "Proteinase K" to prevent m-RNA degradation during isolation from He La cells
Biochim. Biophys. Res. Comm. (1971) 44, No 2, 513 - 519

(21) S.L. Mendelsohn und D.A. Young
Inhibition of ribonuclease
Efficacy of sodium dodecyl sulfate, diethyl pyrocabonate, proteinase K and heparin using a sensitive ribonuclease assay
Biochem. Biophys. Acta (1978) 519, 416 - 473

(22) S. Avital und D. Elson
A Convinient procedure for preparing transfer ribonucleic acid from Escherichia coli
Biochem. Biophys. Acta (1969) 179, 297 - 307

(23) R.S. Man und G.D. Novelli
Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method
Arch. Biochem. Biophys. (1961) 94, 48 - 53

(24) L. Sachs
Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York (1968)

(25) E. Majchrowicz
Induction of physical dependence on alcohol and the associated metabolic and behavioral changes in the rat
Pharmacologist (1973) 15, 159

(26) W.A. Hunt
Changes in the neuro-excitability of alcohol-dependent rats undergoing withdrawal as measured by the pentylenetetrazole seizure threshold
Neuropharmacol. (1973) 12, 1097 - 1102

(27) C.F. Essig und R.C. Lam
Convulsions and hallucinatory behavior following alcohol withdrawal in the dog
Arch. Neurol. (1968) 18, 626 - 632

(28) H.H. Mitchell und J.R. Beadles
The paired-feeding method in nutrition experiments and its application to the problem of cystine deficiencies in food proteins
J. Nutr. (1930) 2, 225 - 243

(29) C.S. Lieber D.P. Jones, J. Mendelson und L.M. DeCarli
Fatty liver, hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption, despite adequate dietary intake
Trans. Assoc. Am. Physicians (1963) 76, 289 - 301

(30) C.S. Lieber und L.M. DeCarli
Ethanol dependence and tolerance:
A nutritionally controlled experimental model in the rat
Res. Comm. Chem. Path. Pharm. (1973) 6, 983 - 991

(31) G. Freund
Alcohol withdrawal syndrome in mice
Arch. Neurol. (1969) 21, 315 - 320

(32) G. Freund
Alcohol, barbiturate and bromide withdrawal syndrome in mice
In: Recent Advances in Studies of Alcoholism,
N.D. Mello and J.H. Mendelson (eds.)
U.S. Government Printing Office, Washington
D.C. (1971) 453 - 471

(33) G. Freund und D.W. Walker
Sound-induced seizures during ethanol withdrawal in mice
Psychopharmacologia (1971) 22, 45 - 59

(34) G. Freund
Alcohol, barbiturate and bromide withdrawal syndrome in mice
Ann. New York Acad. Sciences (1973) 215,
224 - 234

(35) M. Branchey, G. Raucher, B. Kissin
Modifications in the response to alcohol following the establishment of physical dependence
Psychopharmacologia (1971) 22, 314 - 322

(36) B.E. Hunter, D.W. Walker, C.A. Boast und S.F. Zornetzer
Ethanol dependence in the rat : Neural and behavioral correlates
Pharmacol. Biochem. Behav. (1973) 1, 719 - 725

(37) M.E. Heintzelmann, J. Best und R.J. Senter
Polydipsia - induced alcohol dependency in rat: a reexamination
Science (1976) 191, 482 - 483

(38) H. Ogata, F. Ogata, J.H. Mendelson und N.K. Mello
In: Recent Advances in Studies of Alcoholism
N.K. Mello und J.H. Mendelson (eds.)
U.S. Government Printing Office, Washington D.C. (1971) pp. 472 - 507

(39) T.J. Cicero und T.N. Badger
Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat
J. Pharmacol. Exp. Ther. (1977) 201, 427 - 433

(40) T.J. Cicero
Tolerance to and Physical Dependence on Alcohol
Behavioral and Neurobiological Mechanisms
In: Psychopharmacology: A Generation of Progress
M.A. Lipton, A. DiMascio und K.F. Killam (eds)
Raven Press New York (1978) 1603 - 1617

(41) L. Valzelli und S. Bernasconi
Differential activity of some psychotropic drugs as a function of emotional level in animals
Psychopharmacologia (Berl.) (1971) 20, 91 - 96

(42) ICN Nutritional Biochemicals
Physiological data for common laboratory animals
(1981)

(43) K. Drepper und J. Wenk
Versuchstierernährung
Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg
(1972) Seite 15

(44) F. Ratcliffe

Ethanol dependence in the rat:

Its production and characteristics

Arch. Int. Pharm. Ther. (1972) 196,

146 - 156

Lebenslauf

03.12.1952	geboren in Neukirchen-Vluyn
1959 - 1964	Besuch der Volksschule "Diesterweg" in Kamp-Lintfort
1964 - 1972	Besuch des Städtischen neusprachlichen und mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasiums Kamp-Lintfort
31.05.1972	Erwerb der Hochschulreife
01.10.1974 - 30.09.1974	Ableistung des Wehrdienstes und Entlassung als Leutnant der Reserve
01.10.1974 - 30.01.1977	Besuch der Krankenpflegeschule der Städtischen Krankenanstalten Krefeld
02.02.1977	Ablegung des Krankenpflegeexamens
WS 1976	Studium an der Universität Düsseldorf im Fach Humanmedizin
11.09.1978	ärztliche Vorprüfung
14.09.1979	erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
18.09.1980	Heirat mit Gudula Greife, geb. Ripkens
02.04.1982	zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
19.04.1982	Beginn des Internatsjahres in den Städtischen Krankenanstalten Krefeld